



REC'D	13 JUN 1997
WIPO	PCT

Bescheinigung

PRIORITY DOCUMENT

Herr Professor Dr.med. Dr.h.c. Wolf-Georg F o r s s m a n n
in Hannover/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der
Bezeichnung

"Verfahren zur Gewinnung und Anwendung eines bio-
logisch aktiven Eiweisstoffes - Kollagenfragment
HF-COLL-18/514cf - in partiell aufgereinigter
und synthetischer Form aus Körperflüssigkeiten
zur Beeinflussung des Zellwachstums und der
Diagnose von Kollagenerkrankungen sowie der
Osteoporose"

am 22. April 1996 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole
C 07 K, A 61 K und G 01 N der Internationalen Patentklassifika-
tion erhalten.

München, den 13. Mai 1997
Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Aktenzeichen: 196 15 710.2

Nietledt



Offenlegungsschrift

Bundesrepublik Deutschland

Deutsches Patentamt DEE

Aktenzeichen

Anmeldetag 22.04.1996

Offenlegungstag

71 Anmelder:

Forssmann, Wolf-Georg, Prof.Dr.med.

D - 30625 Hannover DE

72 Erfinder:

Schrader, Michael, Dr.rer.nat.

D-30625 Hannover DE

Forssmann, Wolf-Georg, Prof.Dr.med.

D-30625 Hannover DE

Raida, Manfred, Dr.phil.nat.

D-30625 Hannover DE

Schulz-Knappe, Peter, Dr.med

D-30625 Hannover DE

Patentantrag

**Verfahren zur Gewinnung und Anwendung eines biologisch aktiven Eiweisstoffes -
Kollagenfragment HF-COLL-18/514cf - in partiell aufgereinigter und synthetischer
Form aus Körperflüssigkeiten zur Beeinflussung des Zellwachstums und der
Diagnose von Kollagenerkrankungen sowie der Osteoporose.**

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines Eiweisstoffes in reiner oder partiell aufgereinigter Form aus menschlichen Körperflüssigkeiten, der die Fähigkeit besitzt, das Wachstum von Zellen zu beeinflussen. Dieser Stoff ist dadurch gekennzeichnet, daß er insbesondere aus Hämofiltrat oder Hämodialysat, das aus menschlichem Blut abfiltriert wird, gewonnen werden kann. Der Stoff ist als HF-COLL-18/514cf bezeichnet und kann zum Zwecke (1) der Analyse von Erkrankungen, (2) zur medizinischen und gewerblichen Verwendung als Medikament benutzt werden.

Der Stoff HF-COLL-18/514cf wurde erstmals aus dem Hemofiltrat Nierenkranker nach Ultrafiltration am Hemodialyseapparat gewonnen und wurde nach seiner molekularen Masse und den 30 Aminosäuren des N-Terminus charakterisiert. Zur Darstellung des HF-COLL-18/514cf wurde ein patentiertes Verfahren (Forssmann, 1988; Offenlegungsschrift DE 3633707A1) verfeinert, welches zuvor für Gewinnung von Eiweißstoffen aus Hemofiltrat erfunden wurde. Aus den mit diesem Verfahren gewonnenen Molekülen von einem Molukulargewicht unter 20 Kilodalton, die bei veno-venöser oder arterio-venöser Shuntverbindung abfiltriert werden, können die das HF-COLL-18/514cf enthaltende Fraktionen überraschenderweise durch Massenspektrometrie erkannt werden. Es wurde weiter festgestellt, daß bei speziellen weiteren Verfahren diese Substanz erstaunlicherweise derart aufgereinigt werden konnte, bis schließlich ein einheitlicher Eiweißstoff identifiziert und in seiner Struktur aufgeklärt wurde. Der Stoff ist überraschenderweise eine Variante eines Fragmentes von einem Protein, wobei das Protein bisher lediglich auf cDNA-Ebene bekannt ist (Oh et al., 1994, Genomics Vol. 19, S. 494). Der Wert dieser Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß dieser Stoff aus dem bisher als wertlos betrachteten Hemofiltrat aufgereinigt werden kann, um als wirtschaftlich verwertbare Substanz benutzt zu werden.

Damit wurde ein Molekül entdeckt, dessen Struktur bisher unbekannt war und dessen Bildungsstätte im Körper noch ungeklärt ist. Die therapeutische und wirtschaftliche

Verwendung wurde geprüft und das HF-COLL-18/514cf wurde überraschenderweise als wichtiges zirkulierendes Peptid des menschlichen Blutes erkannt.

Der genannte Stoff HF-COLL-18/514cf ist weiter dadurch gekennzeichnet, daß er durch chemische Synthese und durch gentechnologische Produktion gewonnen werden kann und überraschenderweise für zahlreiche weitere Belange genutzt werden kann, u.a. für die Analyse im menschlichen Blut als pathognomonisches Diagnosemerkmal von Erkrankungen des Binde- und Stützgewebes, insbesondere Osteoporose, des Urogenitaltraktes sowie des Respirationstraktes, des cardiovasculären Systems und des Nervenapparates.

Die vorliegende Erfindung betrifft also ein neues Peptid, das HF-COLL-18/514cf, seine Herstellung, dieses enthaltende Arzneimittel sowie dieses enthaltende Aufbereitungen und seine Verwendung dafür.

Das Blutpeptid HF-COLL-18/514cf hat die aminoterminal Sequenz

Val-Ala-Arg-Asn-Ser-Pro-Leu-Ser-Gly-Gly-Met-Arg-Gly-Ile-Arg-Gly-Ala-Asp-Phe-Gln-
Cys-Phe-Gln-Gln-Ala-Arg-Ala-Val-Gly-Leu...

sowie seine natürlichen und pharmakologisch verträglichen Derivate, insbesondere amidierete, acetylierte, phosphorylierte und glycosylierte HF-COLL-18/514cf-Derivate und Fragmente des Peptides. Durch Massenspektrometrie konnte ein Molekulargewicht von 18.493(3) Dalton festgestellt werden.

Damit ist weiter Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein neues Peptid, das HF-COLL-18/514cf, bereitzustellen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es als ein gut zugängliches Arzneimittel mit biologisch und therapeutischer Aktivität eines natürlichen Analogons des im Blut vorkommenden Stoffes verwandt werden kann.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Herstellungsverfahrens für dieses HF-COLL-18/514cf sowie die Anwendung des HF-

COLL-18/514cf als Arzneimittel für verschiedene therapeutische und diagnostische Indikationen. Dazu kann das HF-COLL-18/514cf als hochreiner Stoff oder - wenn für die bestimmte Verwendung ausreichend - innerhalb eines teilweise aufgereinigten Peptidgemisches verwandt werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiter verschiedene Verfahren zur Herstellung dieses HF-COLL-18/514cf oder seiner Derivate dadurch gekennzeichnet, daß dieses über eine prokaryontische oder eine eukaryontische Expression hergestellt und chromatographisch gereinigt wird, sowie ein weiteres Verfahren zur Herstellung der HF-COLL-18/514cf bezogenen Moleküle bzw. seiner Derivate, indem man es aus menschlichem Blut über Chromatographie-Verfahren in bekannter Weise isoliert, und schließlich ein Verfahren zur Herstellung des HF-COLL-18/514cf oder seiner Derivate, indem man diese HF-COLL-18/514cf-Moleküle durch die üblichen Verfahren der Festphasen- und Flüssigphasen-Synthese aus den geschützten Aminosäuren, die in der angegebenen Sequenz enthalten sind, herstellt, deblockiert und es mit den gängigen Chromatographie-Verfahren reinigt.

Die Arzneimittelzubereitung enthält HF-COLL-18/514cf oder ein physiologisch verträgliches Salz des HF-COLL-18/514cf. Die Form und Zusammensetzung des Arzneimittels, welches das HF-COLL-18/514cf enthält, richtet sich nach der Art der Verabreichung. Das humane HF-COLL-18/514cf kann parenteral, intranasal, oral und mittels Inhalation verabreicht werden. Vorzugsweise wird HF-COLL-18/514cf zu einem Injektionspräparat, entweder als Lösung oder als Lyophilisat zur Auflösung unmittelbar vor Gebrauch, konfektioniert. Die Arzneimittelzubereitung kann außerdem Hilfsstoffe enthalten, die abfülltechnisch bedingt sind, einen Beitrag zur Löslichkeit, Stabilität oder Sterilität des Arzneimittels leisten oder den Wirkungsgrad der Aufnahme in den Körper erhöhen.

Die zu verabreichende Tagesdosis für HF-COLL-18/514cf hängt von der Indikation und der Anwendung bestimmter Derivate ab. Bei i.v./i.m. Injektion liegt sie im Bereich von 100 bis 1200 Einheiten (μg)/Tag, bei täglicher subcutaner Injektion vorzugsweise bei 300 - 2400 Einheiten (μg)/Tag.

Das erfindungsgemäße Peptid HF-COLL-18/514cf ist dadurch gekennzeichnet, daß es sich besonders auch für die Langzeit-Therapie bei Osteoporose oder anderen Erkrankungen des Stütz- und Bindegewebes eignet und bei Dauerbehandlung keine Immunreaktion auslöst.

Das erfindungsgemäße Präparat ist weiter als Mittel zur Therapie und Diagnose bei Stoffwechselerkrankungen des Stütz- und Bindegewebes, der Atemwege, des Herz-Kreislaufsystems und Urogenitalapparates sowie des Nervensystems einzusetzen, da es zur Herstellung von human verträglichen Antikörpern verwandt werden kann die geeignet sind, Änderungen der Stoffwechsellage dieser Organe festzustellen oder zu beeinflussen.

Beispiel

Isolierung und Charakterisierung von zirkulierendem HF-COLL-18/514cf aus humanem Hämofiltrat

Als Ausgangsmaterial wurde Hemofiltrat verwendet, das in großen Mengen bei der Behandlung niereninsuffizienter Patienten anfällt und alle Plasmabestandteile bis zu einer Molekülgröße von etwa 20.000 Dalton enthält.

I. Gewinnung des Rohpeptidmaterials

Das Hemofiltrat wurde mittels einer Hemofiltrationsanlage der Firma Sartorius unter Verwendung von Cellulosetriacetat-Filtern mit einer Ausschlußgröße von 20.000 Dalton (Typ SM 40042, Sartorius, Göttingen, BRD) gewonnen. Das Filtrat stammte von niereninsuffizienten Patienten, die sich durch Langzeit-Hemofiltration in einer stabilen Stoffwechsellage befanden, und wurde unmittelbar nach der Gewinnung mittels Ansäuern und Abkühlung auf 4 °C gegen proteolytischen Abbau geschützt. In vier Extraktionen mit einer Kationenaustauschersäule (TSK SP 650(M), Merck, Darmstadt, DE) wurden 2860 l Hämofiltrat verarbeitet. 93% der gepoolten Extrakte wurden auf dem obengenannten Säulenmaterial nacheinander durch verschiedene Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten eluiert. Die Rohfraktionen wurden anschließend gefriergetrocknet.

II. Präparative RP-Chromatographie

500 mg von 2200 mg der letzten Rohfraktion wurden mittels präparativer RP-Chromatographie grob nach Hydrophobizität getrennt. Von einer PrepPak Cartridge mit den Dimensionen 47 x 300 mm der Firma Waters wurden Fraktionen abgesammelt. Die Fraktion 31, wurde für die weitere Aufreinigung benutzt.

Gerät:	BioCad HPLC (Perseptive Biosystems, Freiburg, DE)		
Säule:	Waters PrepPak Cartridge 47 x 300 mm		
Material:	Vydac, 300 Å, 15 - 20 µm		
Eluent A:	Wasser mit 10mM HCl		
Eluent B:	Methanol mit 10mM HCl		
Gradient:	0 - 50 %	Eluent B	28,57 min

	50 - 95 %	Eluent B	61,43 min
	95 %	Eluent B	5,71 min
Flußrate:	35 ml / min		
Fraktionen:	50 ml bzw. 1,43 min		
Absorption:	230 nm und 280 nm		

III. Erste analytische RP-HPLC

UV-Absorption während der analytischen RP-Chromatographie der Fraktion 31, die aus der Auftrennung in Abbildung 1 gewonnen wurde. In einem Gradienten auf einer Vydac-Säule (10 x 250 mm Stahlmantel, Material: RP C18, 300 Å, 5 µm) konnte eine weitere Auftrennung erzielt werden. Die Eluenten waren Wasser mit 0,1 Vol% Trifluoressigsäure und Acetonitril mit 0,1 Vol% Trifluoressigsäure.

Gerät:	Kontron HPLC-Anlage
Säule:	Vydac, Stahlmantel 10 x 250 mm
Material:	Vydac RP-C18, 300 Å, 5 µm
Eluent A:	Wasser mit 0,1 Vol% Trifluoressigsäure
Eluent B:	Acetonitril mit 0,1 Vol% Trifluoressigsäure
Gradient:	0 - 60 % Eluent B 50 min
	60 - 80 % Eluent B 5 min
	80 - 0 % Eluent B 5 min
Flußrate:	2 ml / min
Fraktionen:	2 ml bzw. 1min
Absorption:	230 nm

IV. Entdeckung der molekularen Masse des HF-COLL-18/514cf mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Mit einem Vestec BT II (Vestec, Houston, Texas, USA) wurden Massenspektren von dem nativen, gereinigten HF-COLL-18/514cf aus der Präparation im Schritt III mit alpha-Cyano-4-hydroxyzimtsäure als Matrix gemessen. Es zeigen sich Peaks von dem einfach, zweifach und dreifach protoniertem Molekül. Eine molekulare Masse von 18,5 Kilodalton bestimmt. Verschiedene Nebenbestandteile sind noch sichtbar. In den Fraktionen 45 und

46 wurde eine molekulare Masse von 18,5 Kilodalton entdeckt.

V. Zweite analytische RP-HPLC

In einer abschließenden analytischen RP-Chromatographie von den gepoolten Fraktionen 45 und 46, die aus der Auftrennung in Schritt III gewonnen wurden, konnte in der Fraktion 25 hochaufgereinigtes HF-COLL-18/514cf isoliert werden.

Gerät: Kontron HPLC (Kontron, München, DE)
Säule: YMC, Stahlmantel 4,6 x 250 mm
Material: YMC RP-C18, 300 Å, 5 µm
Eluent A: Wasser mit 0,1 Vol% Trifluoressigsäure
Eluent B: 80 % Acetonitril, 20 % Wasser
(V : V) mit 0,1 Vol% Trifluoressigsäure
Gradient: 0 - 30 % Eluent B 5 min
30 - 80 % Eluent B 150 min
80 - 100 % Eluent B 5 min
100 % Eluent B 5 min
Flußrate: 0,6 ml / min
Fraktionen: manuell abgesammelt
Absorption: 230 nm und 280 nm

VI. Reinheitsbestimmung mittels Kapillar-Zonen-Elektrophorese

5 µl der Fraktion 25 wurden direkt zur Messung in der Kapillar-Zonen-Elektrophorese verwendet. Das Elektropherogramm zeigt lediglich einen Peak und keine weiteren Peaks von Nebenbestandteilen. Dieses Ergebnis zeigt, daß in der Endreinigungsstufe ein hochreines HF-COLL-18/514cf vorlag.

Gerät: P/ACE System 2000, Beckman Instruments GmbH, München, DE
Kapillare: Uncoated Fused Silica, 500 mm x 75 µm ID
Puffer: 100 mM Natriumphosphat pH 2,5
0,02 % Hydroxypropylmethylcellulose
Temperatur: 25 °C

Injektion: 20 sec entspricht 120 nl

Laufzeit: 25 Minuten

Strom: 80 mA, konstant

Absorption: 200 nm

VII. Bestimmung der molekularen Masse von HF-COLL-18/514cf

Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie auf einem Vestec BT II des nativen, gereinigten HF-COLL-18/514cf aus Fraktion 25 im Schritt V konnten auf zwei Matrices (alpha-Cyano-4-hydroxymethylsäure und 2,5-Dihydroxybenzoesäure) Spektren erhalten werden. Es zeigen sich Peaks von dem einfach, zweifach und dreifach protoniertem Molekül. Die molekulare Masse wird mit 18507(20) Dalton bestimmt. Nebenbestandteile sind nicht sichtbar.

Für eine genauere Bestimmung der molekularen Masse des nativen, gereinigten HF-COLL-18/514cf wurde aus Fraktion 25 des Schrittes V zusätzlich ein Massenspektrum mit einem Elektrospray-Massenspektrometer (Sciex API III, Perkin-Elmer, Langen, DE) gemessen. Es zeigen sich Peaks von dem acht- bis elffach protoniertem Molekül. Die molekulare Masse von HF-COLL-18/514cf wird hier mit 18493(3) Dalton bestimmt.

Patentansprüche

1. HF-COLL-18/514cf mit der aminoterminalen Sequenz

Val-Ala-Arg-Asn-Ser-Pro-Leu-Ser-Gly-Gly-Met-Arg-Gly-Ile-Arg-Gly-Ala-Asp-Phe-Gln-
Cys-Phe-Gln-Gln-Ala-Arg-Ala-Val-Gly-Leu...

sowie seine natürlichen und pharmakologisch verträglichen Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, phosphorylierte und glycosylierte HF-COLL-18/514cf -Derivate. Weiterhin natürliche und künstliche Fragmente mit biologischer Wirkung, die aus der Aminosäuresequenz abgeleitet werden.

2. Verfahren zur Herstellung des HF-COLL-18/514cf oder seiner Derivate und seiner Fragmente nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß dieses über eine prokaryontische oder eine eukaryontische Expression hergestellt und chromatographisch gereinigt wird.

3. Verfahren zur Herstellung des HF-COLL-18/514cf oder seiner Derivate und seiner Fragmente nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß man es aus menschlichem Blut über übliche Chromatographie-Verfahren in bekannter Weise isoliert.

4. Verfahren zur Herstellung des HF-COLL-18/514cf oder seiner Derivate und seiner Fragmente nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß man das HF-COLL-18/514cf oder seine Derivate durch die üblichen Verfahren der Festphasen- und Flüssigphasen-Synthese aus den geschützten Aminosäuren, die in der ausgegebenen Sequenz enthalten sind, herstellt, deblockiert und es mit den gängigen Chromatographie-Verfahren reinigt.

5. Arzneimittel, enthaltend das humane, zirkulierende HF-COLL-18/514cf oder seiner Derivate und seiner Fragmente nach Anspruch 1 oder hergestellt nach Ansprüchen 2 bis 4, das HF-COLL-18/514cf als aktiven Wirkstoff neben üblichen Hilfs- und Zusatzstoffen.

6. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Behandlung von Erkrankungen des menschlichen Organismus, insbesondere mit Beteiligung des Stütz- und Bindegewebes.

7. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Behandlung von Erkrankungen des menschlichen Organismus, insbesondere mit Beteiligung der Atemwege und des Urogenitalapparates.

8. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Behandlung von Erkrankungen des menschlichen Organismus, insbesondere mit Beteiligung des Herzkreislauf- und Nervensystems.

9. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Behandlung von Erkrankungen des menschlichen Organismus, insbesondere mit Beteiligung des Integumentes und der Sinnesorgane.

10. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Behandlung von Systemerkrankungen bei Überproduktion oder Mangel von HF-COLL-18/514cf , insbesondere bei z.B. durch Anwendung gegen dieses gebildete Antikörper oder zur Verwendung von HF-COLL-18/514cf zur Substitutionstherapie.

11. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Behandlung von chronischen Erkrankungen, teils vergesellschaftet mit Erkrankungen gemäß Ansprüchen 6 bis 10, indem es in geeigneter Form für die Behandlung für die Elektrolytwirkung bei Erkrankungen auf den Knochenumbau (Osteoporose) oder am Zahnapparat benutzt wird.

12. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Behandlung von akuten Erkrankungen, gemäß Ansprüchen 6 bis 12, indem es in geeigneter Form für die Behandlung in der Intensivpflege dieser Erkrankungen benutzt wird.

13. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 zur Diagnose von Erkrankungen,

insbesondere nach irgendeinem der Ansprüche 6 bis 12, indem spezifische Antikörper gegen synthetische Teilstücke oder das gesamte Peptid oder seiner Derivate und seiner Fragmente hergestellt werden und die Blutkonzentration HF-COLL-18/514cf über Immuntests gemessen wird.

14. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 5 in verschiedenen galenischen Applikationsformen, insbesondere der lyophilisierten, mit Mannit aufgenommenen Form in sterilen Ampullen zur Auflösung in physiologischer Kochsalzlösung und/oder Infusionslösungen zur wiederholten Einzelinjektion und/oder Dauerinfusion in Mengen von 30 Mikrogramm bis 30 Milligramm reines HF-COLL-18/514cf pro Therapie-Einheit.

THIS PAGE BLANK (USPTO)